

12.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 5 0 2 5 3
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 5 0 2 5 3]

REC'D 02 DEC 2004	
WIPO	PCT

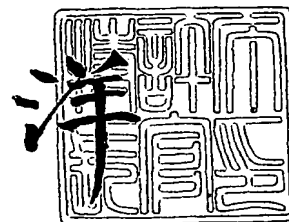
出 願 人 タカラバイオ株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 4 6 7 3

【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1856
【提出日】 平成15年10月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 9/22

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 安本 雅純

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 瀧田 雅光

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 日野 文嗣

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】
【識別番号】 302019245
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 173212
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

FLT3 mRNA の発現を抑制するための RNA 干渉剤であって、下記群から選択される領域を標的とすることを特徴とする RNA 干渉剤。

- (a) 配列表の配列番号 27 記載の cDNA 塩基配列を有する膜近傍領域、
- (b) 配列表の配列番号 28 記載の cDNA 塩基配列を有するキナーゼ領域、あるいは
- (c) 配列表の配列番号 29 記載の cDNA 塩基配列を有する ATP 結合部位領域。

【請求項 2】

鎖長が約 15 ～ 25 塩基対であることを特徴とする請求項 1 記載の RNA 干渉剤。

【請求項 3】

配列表の配列番号 1、4、又は 7 記載の塩基配列のいずれかを含有することを特徴とする RNA 干渉剤。

【請求項 4】

配列表の配列番号 2 及び 3、5 及び 6、又は 8 及び 9 記載の塩基配列の組み合わせからなる RNA 干渉剤。

【請求項 5】

哺乳動物細胞内で請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の RNA 干渉剤を発現させるための RNA 干渉ベクター。

【請求項 6】

RNA ポリメラーゼ III プロモーター、あるいは RNA ポリメラーゼ II プロモーターを含有することを特徴とする請求項 5 記載の RNA 干渉ベクター。

【請求項 7】

U6 プロモーター、H1 プロモーター、tRNA プロモーター、あるいは CMV プロモーターから選択されるプロモーターを含有する請求項 6 記載の RNA 干渉ベクター。

【請求項 8】

アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターから選択されることを特徴とする請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の RNA 干渉ベクター。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の RNA 干渉剤又は RNA 干渉ベクターを用いた FLT3 mRNA 高発現白血病細胞および／または FLT3 / ITD 変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させる方法。

【請求項 10】

さらにキナーゼを阻害する薬剤の使用を組み合わせた請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 記載の方法のための組成物であって、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の RNA 干渉剤又は RNA 干渉ベクターを含有することを特徴とする組成物。

【請求項 12】

請求項 9 又は 10 記載の方法のためのキットであって、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の RNA 干渉剤又は RNA 干渉ベクターを含有することを特徴とするキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】ヒト FLT3 mRNAに対するRNA干渉剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト FLT3 mRNAを分解するRNA干渉剤およびその含有物に関する。本発明はまた、FLT3をダウンレギュレーションする方法ならびに該方法のための組成物ならびにキットに関する。

【背景技術】

【0002】

白血病の遺伝子治療は長年にわたって研究されている（例えば、非特許文献1または2参照）。そして、現実に臨床研究も開始されている（例えば、非特許文献3または4参照）。さらに、アンチセンス技術やリボザイム技術を用いたRNAベースの治療技術も開発されつつある（例えば、非特許文献5参照）。

【0003】

一方、1998年に報告された線虫におけるRNA干渉（RNA interference、RNAi）は、二本鎖RNAによって配列特異的なmRNA分解が生じることによる遺伝子発現の抑制現象として注目された（例えば、非特許文献6参照）。このメカニズムとしては、まず長鎖2本鎖RNAは、Dicerと呼ばれるRNase IIIタイプの活性によりsiRNA（short interfering RNA）と呼ばれる21～25ヌクレオチドの短鎖RNAに分解され、続いてRISC（RNA-induced silencing complex）と呼ばれるリボ核酸タンパク質複合体に組み込まれ、標的RNAにATP依存的に結合し、標的RNAを分解するとされている（例えば、非特許文献7～12参照）。その後、哺乳動物細胞でもRNA干渉を応用して遺伝子発現を抑制することが可能となり（例えば、非特許文献13または14参照）、白血病に特有なBCR-ABLやAML1-MTG8といったキメラmRNAの発現を抑制するRNA干渉剤が報告された（例えば、非特許文献15または16参照）。

【0004】

FLT3（FMS-like tyrosine kinase 3）は、造血細胞の増殖因子であるFL（FLT3リガンド）の受容体であり、KIT、M-CSF、PDGFを含むType III receptor tyrosine kinase（TRK）ファミリーに属する膜結合型チロシンキナーゼ受容体のひとつである。FLT3は、5つの細胞外イムノグロブリン様ドメインと1つの膜貫通ドメインとそれに続く膜近傍ドメインとTK1、TK2という2つのサブドメインからなる細胞内キナーゼドメインから構成される受容体である。FLのFLT3への結合により、受容体の2量体化と受容体キナーゼの活性化がおこり、細胞内へのシグナル伝達を開始される。FLT3は、特に造血細胞の腫瘍化や増殖に関与する重要な分子である（例えば、非特許文献17～19参照）。また、FLT3ノックアウト実験より、健康なマウスに成長するが、初期造血細胞の欠乏状態を示すこと（例えば、非特許文献20参照）や正常骨髓細胞ではCD117を強発現しているCD34+細胞に限定されて発現している（例えば、非特許文献21参照）。

【0005】

一方、白血病細胞ではAML（急性骨髄性白血病、acute myeloid leukemia）、ALL（急性リンパ性白血病、acute lymphocytic leukemia）、CML（慢性骨髄性白血病、chronic myeloid leukemia）などの70～100%で正常骨髓細胞に比べ1000～10000倍というFLT3の高発現が観察されることが報告されている（例えば、非特許文献22参照）。さらに、FLT3の膜貫通部直下をコードする膜近傍領域に縦列重複変異（FLT3/ITD変異、ITD: internal tandem duplication）が発見され、AMLの20～30%、APL（急性前骨髄球性白血病、acute promyelocytic leukemia、現在のFAB分類においてはAML:M3と称する）の20%、MDS（骨髓異形成症候群、myelodysplastic syndrome）

ndrome)の5%に検出され、病態や予後不良の独立した因子であることが証明された(例えば、特許文献1または非特許文献23~26参照)。FLT3/ITD変異が存在する場合はリガンド非依存性のキナーゼ活性化がおこっている。このように、FLT3ならびにFLT3/ITD変異遺伝子の発現を阻害することは白血病細胞の増殖シグナル伝達の大元を阻害することになり、白血病細胞の増殖を阻害することが期待される。

【0006】

これらの経緯から、FLT3のキナーゼ活性を阻害する低分子化合物のスクリーニングが盛んに検討されつつあるが、副作用や薬剤耐性の問題もあり医薬品として有効な化合物は未だ確立されていない(例えば、非特許文献27~29参照)。したがって、白血病の予後不良の要因であるFLT3の高発現やITD変異を有する患者の治療は現状、骨髓移植法しかなく、白血病の約25%つまり全世界で年間数万人のFLT3異常を有する患者を救命できない状態にあり、革新的な治療法の開発が望まれている。

【0007】

【特許文献1】国際公開第00/11470号パンフレット

【非特許文献1】Holt J. T.、他2名、Molecular Cellular Biology、第8巻、第2号、963~973頁(1988年)

【非特許文献2】Bettinger T.、Read M. L.、Current Opinion in Molecular Therapeutics、第3巻、第8号、116~124頁(2001年)

【非特許文献3】Verzeletti S.、他6名、Human Gene Therapy、第9巻、第15号、2243~2251頁(1998年)

【非特許文献4】Wierda W. G.、Kipps T. J.、Seminars in Oncology、第27巻、第5号、502~511頁(2000年)

【非特許文献5】Gewirtz A. M.、他2名、Blood、第92巻、第3号、712~736頁(1998年)

【非特許文献6】Fire A.、他5名、Nature、第391巻、第806~811頁(1998年)

【非特許文献7】Bernstein E.、他3名、Nature、第409巻、第6818号、363~366頁(2001年)

【非特許文献8】Tuschl T.、他4名、Genes and Development、第13巻、第24号、3191~3197頁(1999年)

【非特許文献9】Zamore P. D.、他3名、Cell、第101巻、第1号、25~33頁(2000年)

【非特許文献10】Nykanen A.、他2名、Cell、第107巻、第3号、309~321頁(2001年)

【非特許文献11】Elbashir S. M.、他2名、Genes and Development、第15巻、第2号、188~200頁(2001年)

【非特許文献12】Lipardi C.、他2名、Cell、第107巻、第3号、297~307頁(2001年)

【非特許文献13】Elbashir S. M.、他5名、Nature、第411巻、第6836号、494~498頁(2001年)

【非特許文献14】Caplen N. J.、他4名、Proc Natl Acad Sci USA、第98巻、第17号、9742~9747頁(2001年)

【非特許文献15】Wilda M.、他3名、Oncogene、第21巻、第37号、5716~5724頁(2002年)

【非特許文献16】Heidenreich O.、他7名、Blood、第101巻、第8号、3157~3163頁(2003年)

【非特許文献17】Rosnet O.、他3名、Oncogene、第6巻、第9号、1641~1650頁(1991年)

【非特許文献18】Rosnet O.、他7名、Blood、第82巻、第4号、1110～1119頁(1993年)

【非特許文献19】Lyman S. D.、他5名、Oncogene、第8巻、第4号、815～822頁(1993年)

【非特許文献20】Mackarechtschian K.、Immunity、第3巻、第1号、147～161頁(1995年)

【非特許文献21】Rosnet O.、他10名、Leukemia、第10巻、第2号、238～248頁(1996年)

【非特許文献22】Drexler H. G.、Leukemia、第10巻、第4号、588～599頁(1996年)

【非特許文献23】Nakao M.、他8名、Leukemia、第10巻、第21号、1911～1918頁(1996年)

【非特許文献24】Yokota S.、他10名、Leukemia、第11巻、第10号、1605～1609頁(1997年)

【非特許文献25】Kiyoi H.、他19名、Leukemia、第11巻、9号、1447～1452頁(1997年)

【非特許文献26】Gilliland D. G.、Griffin J. D.、Blood、第100巻、第5号、1532～1542頁(2002年)

【非特許文献27】Levis M.、他9名、Blood、第99巻、第11号、3885～3891頁(2002年)

【非特許文献28】O'Farrell A. M.、他14名、Blood、第101巻、第9号、3597～3605頁(2003年)

【非特許文献29】Giles F. J.、他16名、Blood、第102巻、第3号、795～801頁(2003年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の主な目的は、ヒト FLT3 mRNAを分解するRNA干渉剤とその含有物を提供することにある。また、本発明の主な目的は、FLT3をダウンレギュレーションする方法、該方法のための組成物並びにキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意研究した。その結果、FLT3をダウンレギュレートすることでFLT3 mRNA高発現白血病細胞、FLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を優先的に抑制し、アポトーシスを誘発することができ、本発明を完成させた。

【0010】

すなわち、本発明の第1の発明は、FLT3 mRNAの発現を抑制するためのRNA干渉剤であって、下記群から選択される領域を標的とすることを特徴とするRNA干渉剤に関する。

- (1) 配列表の配列番号27記載のcDNA塩基配列を有する膜近傍領域、
- (2) 配列表の配列番号28記載のcDNA塩基配列を有するキナーゼ領域、あるいは
- (3) 配列表の配列番号29記載のcDNA塩基配列を有するATP結合部位領域。

【0011】

本発明の第1の発明において、RNA干渉剤は鎖長が約15～25塩基対であるものが好ましい。特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号1、4、又は7記載の塩基配列を有するものが挙げられる。さらに例えば、配列表の配列番号2及び3、5及び6、又は8及び9記載の塩基配列の組み合わせからなるものが好適に使用できる。

【0012】

本発明の第2の発明は、哺乳動物細胞内で本発明の第1の発明のRNA干渉剤を発現さ

せるためのRNA干渉ベクターに関する。

【0013】

本発明の第2の発明のベクターにおいて、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、あるいはRNAポリメラーゼIIプロモーターを含有していても良い。特に限定はされないが例えば、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーター、あるいはCMVプロモーターから選択されるプロモーターを含有するものが好ましく、さらに該ベクターは、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターのいずれかが好適に使用できる。

【0014】

本発明の第3の発明は、本発明の第1あるいは第2の発明のRNA干渉剤又はRNA干渉ベクターを用いたFLT3 mRNA高発現白血病細胞および／またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させる方法に関する。また、本発明の第3の発明の方法に、さらにキナーゼを阻害する薬剤の使用を組み合わせても良い。

【0015】

本発明の第4の発明は、本発明の第3の発明の方法のための組成物であって、本発明の第1あるいは第2の発明のRNA干渉剤又はRNA干渉ベクターを含有することを特徴とする組成物に関する。

【0016】

本発明の第5の発明は、本発明の第3の発明の方法のためのキットであって、本発明の第1あるいは第2の発明のRNA干渉剤又はRNA干渉ベクターを含有することを特徴とするキットに関する。

【発明の効果】

【0017】

本発明により、従来のアンチセンス技術やリボザイム技術とは異なる、FLT3遺伝子の発現抑制に使用できるRNA干渉剤が提供される。当該FLT3 RNA干渉剤として化学合成されたsiRNAならびにその誘導体、またはsiRNAを細胞内で発現するように構築されたRNA干渉ベクターが提供される。また、本発明のRNA干渉剤あるいはRNA干渉ベクターを利用したFLT3 mRNA高発現細胞および／またはFLT3/ITD変異を有する細胞で選択的にまたは優先的にRNA干渉を起こす方法、該方法のための組成物並びにキットが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

(1) 本発明のRNA干渉剤

本発明のRNA干渉剤は、ヒト FLT3 mRNAの発現を抑制するためのRNA干渉剤であって、(a) 配列表の配列番号27記載のcDNA塩基配列を有する膜近傍領域、(b) 配列表の配列番号28記載のcDNA塩基配列を有するキナーゼ領域、あるいは(c) 配列表の配列番号29記載のcDNA塩基配列を有するATP結合部位領域から選択される領域を標的領域とする。従って、本発明のRNA干渉剤は、上記(a)～(c)の領域の塩基配列から任意に構築することができる。当該RNA干渉剤の鎖長は、例えば、15～25塩基対の鎖長を持つものさらに好ましくは、20～25塩基対の鎖長のものが例示される。さらに、例えば3'末端側に2塩基突出した二本鎖RNAの形状のものが好適に使用でき、好ましくは、21～23merからなり、かつ3'末端にTT配列が付加されたものが例示される。

【0019】

また、本発明の一態様としては、健常人には見られないFLT3遺伝子の縦列重複変異の領域を標的としたRNA干渉剤であっても良い。この場合、上記縦列重複変異領域を含む塩基配列に対応するRNA干渉剤が好適に使用できる。当該領域を用いることにより、FLT3遺伝子の縦列重複変異を有する細胞のみをRNA干渉できる。

【0020】

本発明のRNA干渉剤は、FLT3 mRNA高発現白血病細胞および／またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させることができる。特に限定はされないが、例えば、配列表の配列番号1、4、又は7記載の塩基配列のいずれかを含有するものが好適である。さらに配列表の配列番号2及び3、5及び6、又は8及び9記載の塩基配列の組み合わせからなるRNA干渉剤が例示される。

【0021】

本発明のRNA干渉剤は、特に限定はないが、2'-ACE (2'-bis (acetoxymethoxy) -methylether) または2-TBDMS (2'-tert-butyl dimethylsilyl) 等の保護基を用いた化学合成法により合成することができる。

該siRNAは、特に限定は無いが、安定化や標識化のために化学修飾してもよい。当該修飾基としては、特に限定は無いが、6-フルオレセイン付加、ビオチン付加、2'-O-メチル化、PNA (Peptide Nucleic Acid) 化、アミノ化などが例示される。当該修飾基は、RNA干渉作用を阻害しない限り、5'末端、3'末端あるいは内部塩基のいずれに付加しても良い。また、該siRNAは、特に限定はないが、RNA干渉作用を有すればよく、一本鎖でも二本鎖でもよい。

【0022】

(2) 本発明のRNA干渉ベクター

本発明のベクターは、哺乳動物細胞内で上記(1)のRNA干渉剤を発現させるためのベクターであり、当該細胞内で効率良く発現できるものであれば特に限定はない。上記ベクターとしては、特に限定はないが、例えばプラスミドベクターやアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターが使用できる。前記プラスミドベクターとしては、piGENE tRNAプラスミド (iGENE社製)、siLentGene (Promega社製)、pSEC Hygro Vector (Ambion社製) が挙げられる。アデノウイルスベクターとしては、BD Knockout Adenoviral RNAi System (Becton Dickinson社製) が挙げられる。レトロウイルスベクターとしては、pSIREN-RetroQ Vector (Becton Dickinson社製) が挙げられる。

当該ベクターに用いるプロモーターは、哺乳動物細胞内で機能しうるものであれば特に限定はなく、例えば、RNAポリメラーゼII系プロモーター、RNAポリメラーゼIII系プロモーター、テトラサイクリンで調節可能なプロモーター等が使用できる。また、組織特異的プロモーターを用いることにより、所望の部位、臓器等においてsiRNAの発現が可能となる。特に限定は無いが、例えば、RNAポリメラーゼII系プロモーターとしては、CMVプロモーターが、RNAポリメラーゼIII系プロモーターとしては、tRNAプロモーター、U6 snRNAプロモーター、ヒストンH1プロモーターが、テトラサイクリンで調節可能なプロモーターとしては、テトラサイクリン調節型U6プロモーター、TRプロモーター等が挙げられる。また、上記プロモーターにCre-loxPシステムを付加することにより、より厳密に発現を制御することもできる。

【0023】

本発明のベクターの構築は、以下のストラテジーで実施することができる。

(a) 2次構造予測

抑制すべき遺伝子の2次構造をプログラム等によって予測し、強い2次構造をとる箇所は避けることが好ましい。2次構造予測プログラムとしては、特に限定は無いが、MFOLDプログラム (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>) が使用できる。

【0024】

(b) siRNA配列選定

ターゲット配列は転写因子結合部位を避けることが好ましく、スタートコドンから75 nt以上下流のAAG配列をセンス鎖の5'末端とすることが好ましい。GC含量は、特

に限定は無いが、30～70%、より好ましくは40～60%とすることができる。非特異的作用を防ぐため、設計段階で塩基配列相同性検索を行い、標的配列に特異的であることを確認することが好ましい。

【0025】

(c) ベクター構築

該ベクターの構築方法は、特に限定は無いが、異なる2つのプロモーター制御下にセンスRNAとアンチセンスRNAを順方向配列して別個にセンスRNAとアンチセンスRNAを転写するタンデムタイプと、1つのプロモーター制御下にセンスRNAとアンチセンスRNAを逆方向配列して両者をループで連結したステムループタイプ（またはヘアピンタイプ）が使用できる。特に限定は無いが、反応条件に応じ、タンデムタイプとステムループタイプを使い分けることが好ましい。

【0026】

なお、siRNAターゲット配列は、配列特異的RNAi作用を示す配列であれば特に限定は無いが、RNAポリメラーゼIII系プロモーターを用いる場合、以下の2つの条件を満たすことが好ましい。転写開始点はプリン残基（GまたはA）とする。アンチセンス鎖の3'末端にUUUUが付加されるため、転写開始点の前2塩基はAAとする。RNAポリメラーゼIII系プロモーターを用いる場合、ステムループタイプにすること、および短いポリ（A）配列を付加することが好ましい。

【0027】

以下に本発明の一態様として、FLT3 mRNAを標的とするsiRNA作製方法について説明する。

すなわち、FLT3 mRNAの場合、ITD変異を有するmRNAまたはキナーゼ活性を優先的に抑制させるため、膜近傍領域、ATP結合領域およびキナーゼ活性領域について上記点に注意し配列を選択し、siRNAを合成する。

一方、siRNA転写に用いる発現ベクターはU6 RNAポリメラーゼプロモーターを用いて、U6プロモーターの下流にsiRNAを転写する配列をPCR法で作製挿入し、発現カセットを作製する。また、挿入遺伝子を化学合成し、制限酵素タグを付加し、ベクターに挿入することも可能である。

次に、作製したこれらsiRNAをエレクトロポレーション法やリポフェクション法によって目的mRNA発現細胞にトランスフェクションし、あるいは、標的遺伝子を共トランスフェクションすることで、目的mRNAの発現抑制をスクリーニングする。

一方、細胞へのトランスフェクション効率の改善や、治療用ベクターとしてはアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスベクターに発現カセットを挿入したベクターがRNA干渉剤として利用できる。

【0028】

(3) 本発明の発現抑制及び／又はアポトーシス誘発方法

本発明の発現抑制及び／又はアポトーシス誘発方法は、上記(1)記載のRNA干渉剤又は上記(2)記載のベクターを用いたFLT3 mRNA高発現白血病細胞および／またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させる方法である。

また、上記(1)記載の方法と、キナーゼを阻害する薬剤を用いる方法とを組み合わせても良い。当該キナーゼを阻害する薬剤は、好ましくはチロシンキナーゼを阻害する薬剤、より好ましくはFLT3キナーゼを阻害する薬剤が使用できる。当該薬剤は、特に限定はされないが例えば、インドカルバゾール系誘導体CEP-701（セファロン社製）、キナゾリン系化合物CT53518（ミレニウム ファーマシューティカル社製）、スタウロスポリン誘導体PKC412（CGP41251、ノバルティス社製）、インドリノン系化合物SU11248（スージェン社製）、メタノン誘導体D-64406、D-65476（ASTAメディカ社製）、あるいはAG1295等が挙げられる。

すなわち、本発明の方法においてキナーゼを阻害する薬剤は、上記(1)記載のRNA干渉剤又は上記(2)記載のベクターとの相乗効果により、FLT3キナーゼの発現を選

拮抗的に抑制し、アポトーシスを誘発できるものであれば、いずれもが好適に使用できる。
さらに本発明のFLT3遺伝子の発現抑制及び／又はアポトーシス誘発方法は、FLT3 mRNA高発現白血病細胞および／またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞を有する白血病患者の当該細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させることができ、上記FLT3遺伝子が関与する白血病の治療方法としても利用できる。

【0029】

(4) 本発明の組成物ならびにキット

本発明の組成物は、上記(3)記載の方法のための組成物であって、特に限定はされないが、例えば上記(1)記載のRNA干渉剤又は上記(2)記載のベクターを含有するものが好適に使用できる。

当該組成物には、RNA干渉剤あるいはベクターを安定化させる緩衝溶液を含有しても良い。また、目的の細胞内に当該RNA干渉剤やベクターをトランスフェクションするための試薬を含有していても良い。

また、当該組成物には、ベクターからRNA干渉剤を調製するためのDNA依存型RNAポリメラーゼを含有していても良い。

【0030】

本発明のキットは、上記(3)記載の方法のためのキットであって、特に限定はされないが、例えば上記(1)記載のRNA干渉剤又は上記(2)記載のベクターを含有するものが好適に使用できる。

当該キットには、RNA干渉剤あるいはベクターを安定化させる緩衝溶液を含有しても良い。また、目的の細胞内に当該RNA干渉剤やベクターをエレクトロポレーション法、組織内注射、ハイドロダイナミクス法、リポフェクタミン法、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法などの遺伝子導入するための試薬を含有していても良い。

また当該キットには、ベクターからRNA干渉剤を調製するためのDNA依存型RNAポリメラーゼを含有していても良い。

本発明の組成物又はキットを用いることにより、FLT3 mRNA高発現白血病細胞および／またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させることができる。

【実施例】

【0031】

以下の実施例により、さらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に何ら限定されるものではない。

【0032】

実施例1

(1) 抗FLT3 siRNAの合成と選択

FLT3配列のATP結合領域、キナーゼ領域(TK領域)または膜近傍領域を標的とした有効なsiRNAを、HL-60細胞(FLT3WT低発現)、EoL-1細胞(FLT3WT高発現)およびMV4-11細胞(FLT3/ITD高発現)を用いて検討した。

まず、RNA干渉剤のsiRNAは、タカラバイオ社へ製造委託した。

ATP結合領域の標的配列を配列表の配列番号1に示す。この標的配列に対するsiRNA1のセンス配列を配列表の配列番号2に、アンチセンス配列を配列表の配列番号3に示す。

TK領域の標的配列を配列表の配列番号4に示す。この標的配列に対するsiRNA2のセンス配列を配列表の配列番号5に、アンチセンス配列を配列表の配列番号6に示す。

FLT3/JMD領域の標的配列を配列表の配列番号7に示す。この標的配列に対するsiRNA3のセンス配列を配列表の配列番号8に、アンチセンス配列を配列表の配列番号9に示す。

【0033】

(2) 各細胞への遺伝子導入

各細胞は、以下の培地を用い、5%CO₂存在下、37℃で培養した。

HL-60、EoL-1、MV4-11 (全てATCCより入手) 細胞はRPMI 1640培地 (タカラバイオ社製) に10%牛胎児血清 (FBS) を加えて培養した。

次に合成siRNAのトランスフェクションは、以下のように行った。細胞 (2×10^5 cells/ml) を6ウェルプレート中で24時間予め培養し、細胞を回収し、 1.5×10^5 cells/mlとなるようにOpti-MEM (Invitrogen社製) で懸濁し、これに合成したsiRNAを終濃度200 pmolとなるように添加した。Oligofectamin (Invitrogen社製) 4 μ l/反応を用いてInvitrogen社のプロトコルに添ってtransfectionを行った。なお、コントロールとしてはsiRNA無添加で同様に操作し、また、非特異的影響をBCR/ABLキメラmRNAに対するsiRNAを用いて実施した。

BCR/ABLキメラmRNAの標的配列を配列表の配列番号10に示す。この標的配列に対するsiRNA4のセンス配列を配列表の配列番号11に、アンチセンス配列を配列表の配列番号12に示す。

【0034】

(3) RNA干渉の確認

標的遺伝子のRNA干渉の確認は、リアルタイムRT-PCR法によるmRNA量によって行った。

すなわち、合成siRNAを各細胞にTransfectionし、24時間後にTotal RNAを上記細胞からTrizol試薬 (Invitrogen社製) を用いて抽出し、DNase I (タカラバイオ社製) により処理した。各々メーカーのプロトコルに従って行った。このようにして調製されたRNA 100 ngを鋳型として、配列表の配列番号13および14記載の配列をプライマー (20 pmol) とし、Real Time One Step RNA PCR Kit (タカラバイオ社製) を用いて、SYBER Green I (タカラバイオ社製) で、LightCycler (Roche社製) により測定した。

一方、RNAの標準化にはGAPDH mRNAを配列表の配列番号15および16記載のプライマーを用いて同様に測定した。

【0035】

PCR条件は95℃ 1分に続いて、95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとする40サイクル反応で行った。

【0036】

各siRNAによるFLT3 mRNA干渉の結果を以下の表1に示す。なお、合成siRNAを添加せず、transfection処理だけ行った細胞の相対mRNA発現量 (FLT3 mRNA/GAPDH mRNA) を100%として抑制された%を表示した。

。

【0037】

【表1】

細胞名	siRNA1	siRNA2	siRNA3	siRNA4
MV4-11 (ITD変異)	65% (1.6)	54% (1)	65% (1)	5%
EoL1 (WT 高発現)	41% (1)*	54% (1)	63% (1)	8%
HL60 (WT 低発現)	31%	46%	38%	7%

*: EoL1でのRNA干渉効果を1としたときの抑制相対比

【0038】

以上の結果より、siRNA1はITD変異を有するガン細胞でのFLT3 mRNA

発現を65%抑制し、ITD変異がない(つまりWT)のがん細胞に比較し1.6倍以上選択的に抑制することが示された。一方、siRNA3はITD変異の有無にかかわらず、FLT3高発現を65%抑制し、低発現がん細胞に比較し、1.6倍以上選択的に抑制することが示された。

なお、siRNA2は全てのがん細胞でFLT3 mRNAを抑制するが、その効果は50%前後と弱く選択的ではなかった。

また、FLT3 mRNAとは関係ないsiRNA4ではFLT3 mRNAの抑制は起こらず、FLT3 mRNAへの配列特異性が確認された。

【0039】

実施例2

(1) 合成siRNAの細胞増殖

合成siRNAの細胞増殖ならびにアポトーシスへの影響について検討した。合成siRNA1~3は上記実施例1-(1)と同様のものを用いた。siRNA処理後20時間目に細胞の増殖活性をPremix WST-1試薬(タカラバイオ社製)でメーカーのプロトコルに従い測定した。また、アポトーシス細胞の比率はアポトーシス検出ELISA試薬(Roche社製)でメーカーのプロトコルに従って測定した。なお、実験は各々n=3で実施し、その平均値を求めた。

Premix WST1試薬による細胞増殖測定は、以下のように実施した。 2×10^4 cells/wellの濃度で96ウェルプレートに入れた細胞をRPMI培地(10%FBS含有)で培養した。各種合成siRNA(10nM)でTransfectionし、その後20時間目の増殖活性をPremix WST-1試薬により測定した。コントロール(siRNA無添加でTransfection処理した場合)の増殖能に比較しての相対増殖能(%)を求めた。

【0040】

(2) アポトーシスへの影響

アポトーシス検出法は以下のように実施した。

すなわち、siRNA処理後の細胞をPBSで洗浄し、 5×10^3 cellsからの細胞LysateのCytoplasmic画分をビオチン化抗ヒストン抗体と反応させ、Peroxidase標識抗DNA抗体と反応させるサンドイッチELISAで実施した。非結合抗体を洗浄後、ABTS発色試薬を添加し、405nmの吸光度を測定し、アポトーシスの相対頻度を%で表した。

各種合成siRNAによるFLT3 mRNA発現白血病細胞への増殖活性への影響の結果を表2に示す。

【0041】

【表2】

細胞名	siRNA1	siRNA2	siRNA3
MV4-11 (ITD変異高発現)	56.4% (0.49)	41.4% (0.36)	37.5% (0.41)
EoL1 (WT高発現)	68.5% (0.60)	79.7% (0.70)	45.1% (0.50)
HL60 (WT低発現)	116% (1)*	115% (1)	90.3% (1)

*: HL60でのRNA干渉効果を1としたときの細胞増殖活性比

【0042】

表2に示したように、siRNA1~3は各々FLT3 mRNA高発現がん細胞を選択して増殖抑制することが示された。また、siRNA3はITD変異の有無に関係なく、IC50(50%阻止濃度) 10nMの濃度で高発現がん細胞の増殖を抑制することが示された。

なお、siRNAによって増殖が60%以下に抑制された細胞では、40%以上の細胞でアポトーシスがおこっていることが確認できた。

【0043】

実施例3

siRNA発現カセットの構築を以下に行った。

以下の合成DNAをタカラバイオ社に製造委託した。BamHIサイト、loopサイト、RNA Pol III Terminatorサイト、HindIIIサイトを有するようにsiRNAカセットとして合成し、使用した。

【0044】

ATP結合領域に対するセンス配列を配列表の配列番号17に、アンチセンス配列を配列表の配列番号18に示す。

一方、対照として、上記siRNAとGC含量が同じのスクランブルsiRNAカセットも作成した。センス配列を配列表の配列番号19に、アンチセンス配列を配列表の配列番号20に示す。

【0045】

FLT3/ITD領域に対するセンス配列を配列表の配列番号21に、アンチセンス配列を配列表の配列番号22に示す。

一方、対照として、上記siRNAとGC含量が同じのスクランブルsiRNAカセットも作成した。センス配列を配列表の配列番号23に、アンチセンス配列を配列表の配列番号24に示す。

【0046】

siRNA発現ベクターの構築は以下に行った。

pSilencer 2.1 siRNA Expression Vector Kit (Human U6 Promotor, Hygromycin選択用: Ambion社製) を用いて、メーカープロトコルに従って構築した。上記の合成DNAを90℃、3分間加熱し、直ちに37℃に冷却し、1時間反応させ、アニーリングすることでhairpin siRNAカセットを作成した。このようにアニーリングされたsiRNAカセットをT4 DNA Ligaseを用いてpSilencer VectorにLigationさせた。このようにして構築siRNA発現ベクターを用いて大腸菌コンピテントセル (DH5α、またはJM109) を形質転換し、37℃で1晩、Ampicillin含有LB培地上で培養し、形質転換されたコロニーを選択し、pSilencerプラスミドを精製した。なお、精製されたプラスミドはBamHIならびにHindIII制限酵素消化により陽性クローンを確認した。また、配列表の配列番号25および26記載のシーケンシングプライマーを用いて解析し、hairpin siRNAのインサートを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0047】

本発明により、ヒトFLT3 mRNAを分解するRNA干渉剤あるいはRNA干渉用ベクターが提供される。当該RNA干渉剤又はベクターは、FLT3 mRNA高発現白血病細胞および/またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させる方法に使用することができる。さらに、当該方法のための組成物ならびにキットが提供される。本発明のRNA干渉剤ならびにRNA干渉ベクターは、白血病患者の治療剤として用いることができる。

【配列表フリーテキスト】

【0048】

SEQ ID NO. 1: A partial cDNA sequence of ATP-binding site.

SEQ ID NO. 2: Chimeric oligonucleotide SEQ1-S to construct the siRNA. "nucleotide 3, 6, 11, 16, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 3: Chimeric oligonucleotide SEQ1-AS to construct the siRNA. "nucleotide 7, 10, 13, and 16 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 4: A partial cDNA sequence of TK domain.

SEQ ID NO. 5: Chimeric oligonucleotide SEQ2-S to construct the siRNA. "nucleotide 7, 9, 13, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 6: Chimeric oligonucleotide SEQ2-AS to construct the siRNA. "nucleotide 4, 8, 9, 15, and 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 7: A partial cDNA sequence of FLT3/ITD domain.

SEQ ID NO. 8: Chimeric oligonucleotide SEQ3-S to construct the siRNA. "nucleotide 1, 3, 7, 9, 12, 14, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 9: Chimeric oligonucleotide SEQ3-AS to construct the siRNA. "nucleotide 2, 3, 4, 9, 12, 14, 15, and 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 10: A partial cDNA sequence of bcr/abl chimera domain.

SEQ ID NO. 11: Chimeric oligonucleotide to construct the siRNA. "nucleotide 7, 8, 18, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 12: Chimeric oligonucleotide to construct the siRNA. "nucleotide 7, 8, 9, 10, 15, and 17 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO. 13: PCR primer FLT11F to amplify a gene encoding FLT3.

SEQ ID NO. 14: PCR primer FLT12R to amplify a gene encoding FLT3.

SEQ ID NO. 15: PCR primer G1 to amplify a gene encoding GAPDH.

SEQ ID NO. 16: PCR primer G2 to amplify a gene encoding GAPDH.

SEQ ID NO. 17: Expression cassette FLT3SI1F to expression siRNA for ATP-binding domain. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

SEQ ID NO. 18: Expression cassette FLT3SI1R to expression siRNA for ATP-binding domain. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

SEQ ID NO. 19: Expression cassette FLT3CON1F to expression control sequence. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

SEQ ID NO. 20: Expression cassette FLT3CON1R to expression control sequence. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

SEQ ID NO. 21: Expression cassette FLT3SI3F to expression siRNA for FLT3/ITD domain. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

SEQ ID NO. 22: Expression cassette FLT3SI3R to expression siRNA for FLT3/ITD domain. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

SEQ ID NO. 23: Expression cassette FLT3CON3F to expression control sequence. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

SEQ ID NO. 24: Expression cassette FLT3CON3R to expression control sequence. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

SEQ ID NO. 25: 5' sequencing primer.

SEQ ID NO. 26: 3' sequencing primer.

SEQ ID NO. 27: ATP binding domain.
SEQ ID NO. 28: Tyrosine kinase domain.
SEQ ID NO. 29: Juxtamembrane domain.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> TAKARA BIO INC.
- <120> RNA interference agent for human FLT3 mRNA
- <130> T-1856
- <160> 29
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A partial cDNA sequence of ATP-binding site.
- <400> 1
aagtactag gatcaggtgc t 21
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Chimeric oligonucleotide SEQ1-S to construct the siRNA. "nucleotide 3, 6, 11, 16, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."
- <400> 2
gguacuagga ucaggugcut t 21
- <210> 3
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Chimeric oligonucleotide SEQ1-AS to construct the siRNA. "nucleotide 7, 10, 13, and 16 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."
- <400> 3

agcaccugau ccuaguacct t

21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A partial cDNA sequence of TK domain.

<400> 4
aacaggagtc tcaatccagg t

21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide SEQ2-S to construct the siRNA. "nucleotide 7, 9, 13, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

<400> 5
caggagucuc aauccaggut t

21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide SEQ2-AS to construct the siRNA. "nucleotide 4, 8, 9, 15, and 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

<400> 6
accuggauug agacuccugt t

21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A partial cDNA sequence of FLT3/ITD domain.

<400> 7
aatatgaata tgatctcaaa t

21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide SEQ3-S to construct the siRNA. "nucleotide 1, 3, 7, 9, 12, 14, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

<400> 8
uaugaauaug aucucaaaut t

21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide SEQ3-AS to construct the siRNA. "nucleotide 2, 3, 4, 9, 12, 14, 15, and 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

<400> 9
auuugagauc auauucauat t

21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A partial cDNA sequence of bcr/abl chimera domain.

<400> 10
aagcagagtt caaaagcccu u

21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to construct the siRNA. "nucleotide 7, 8, 18, and 19 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribo nucleotide."

<400> 11

gcagaguuca aaagcccuut t

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to construct the siRNA. "nucleotide 7, 8, 9, 10, 15, and 17 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotide."

<400> 12

aagggcuuuu gaacucugct t

21

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer FLT11F to amplify a gene encoding FLT3.

<400> 13

gcaatttagg tatgaaagcc agc

23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer FLT12R to amplify a gene encoding FLT3.

<400> 14

ctttcagcat ttgacggca acc

23

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer G1 to amplify a gene encoding GAPDH.

<400> 15

caacagcctc aagatcatca gc

22

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer G2 to amplify a gene encoding GAPDH.

<400> 16

ttctagacgg caggtcaggt c

21

<210> 17

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Expression cassette FLT3SI1F to expression siRNA for ATP-binding domain. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

<400> 17

gatcccggta ctaggatcag gtgctttcaa gagaagcacc tgatcctagt accttttttg 60

gaaa

64

<210> 18

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Expression cassette FLT3SI1R to expression siRNA for ATP-binding domain. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindII I restriction site"

<400> 18

ggccatgatc ctatgccacg aaagttctct tcgtggacta ggatcatgga aaaaaccttt 60
tcga 64

<210> 19
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression cassette FLT3CON1F to expression control sequence. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

<400> 19
gatcccgag tcgtagctgc agtatttcaa gagaatactg cagctacgac tccttttttg 60
gaaa 64

<210> 20
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression cassette FLT3CON1R to expression control sequence. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

<400> 20
agcttttcca aaaaaggagt cgtagctgca gtattctctt gaaatactgc agctacgact 60
ccgg 64

<210> 21
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression cassette FLT3SI3F to expression siRNA for FLT3/ITD domain. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

<400> 21
gatccctatg aatatgatct caaatttcaa gagaatttga gatcatattc atatTTTTTg 60
gaaa 64

<210> 22
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression cassette FLT3SI3R to expression siRNA for FLT3/ITD domain. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

<400> 22
agcttttcca aaaaatatga atatgatctc aaattctctt gaaatttgag atcatattca 60
tagg 64

<210> 23
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression cassette FLT3CON3F to expression control sequence. "nucleotide 1 to 5 is BamHI restriction site- nucleotide 26 to 34 is loop site- nucleotide 54 to 59 is RNA polymerase III terminator site"

<400> 23
gatcccaata atttgcttca aagatttcaa gagaatcttt gaagcaaatt atTTTTTTg 60
gaaa 64

<210> 24
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression cassette FLT3CON3R to expression control sequence. "nucleotide 22 to 30 is loop site- nucleotide 50 to 55 is RNA polymerase III terminator site- nucleotide 60 to 64 is HindIII restriction site"

<400> 24
agctttttcca aaaaaaataa tttgcttcaa agattctctt gaaatactgc agctacgact 60
ccgg 64

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' sequencing primer.

<400> 25
gtaatacgac tcactatagg g 21

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' sequencing primer.

<400> 26
aggcgattaa gttgggta 18

<210> 27
<211> 144
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ATP binding domain.

<400> 27
tgtcacaagt acaaaaagca atttaggtat gaaagccagc tacagatggt acaggtgacc 60
ggctcctcag ataatgagta cttctacgtt gatttcagag aatatgaata tgatctcaaa 120
tgggagtttc caagagaaaa ttta 144

<210> 28
<211> 471
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tyrosine kinase domain.

<400> 28

```

acgcaacagc ttatggaatt agcaaaacag gagtctcaat ccagggtgcc gtcaaaatgc      60
tgaaagaaaa agcagacagc tctgaaagag aggcactcat gtcagaactc aagatgatga      120
cccagctggg aagccacgag aatattgtga acctgctggg ggcgtgcaca ctgtcaggac      180
caatttactt gatttttgaa tactgttgct atggatgatct tctcaactat ctaagaagta      240
aaagagaaaa atttcacagg acttgacag agattttcaa ggaacacaat ttcagttttt      300
acccacttt ccaatcacat ccaaattcca gcatgcctgg ttcaagagaa gttcagatac      360
acccggactc ggatcaaatc tcagggttc atgggaattc atttcactct gaagatgaaa      420
ttgaatatga aaacaaaaa aggctggaag aagaggagga cttgaatgtg c                471

```

<210> 29

<211> 517

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Juxtamembrane domain.

<400> 29

```

gagtttggga aggtactagg atcagggtgct tttggaaaag tgatgaacgc aacagcttat      60
ggaattagca aaacaggagt ctcaatccag gttgccgtca aaatgctgaa agaaaaagca      120
gacagctctg aaagagaggc actcatgtca gaactcaaga tgatgaccca gctgggaagc      180
cacgagaata ttgtgaacct gctgggggcg tgcacactgt caggaccaat ttacttgatt      240
tttgaatact gttgctatgg tgatcttctc aactatctaa gaagtaaaag agaaaaattt      300
cacaggactt ggacagagat tttaaggaa cacaatttca gtttttacc cactttccaa      360
tcacatcaa attccagcat gcctgggtca agagaagttc agatacacc ggactcggat      420
caaatctcag ggcttcatgg gaattcattt cactctgaag atgaaattga atatgaaaac      480
caaaaaaggc tggaagaaga ggaggacttg aatgtgc                                517

```


【書類名】要約書

【要約】

【課題】

ヒト・FLT3 mRNAを分解するRNA干渉剤とその含有物の提供、FLT3をダウンレギュレーションすることによる白血病の治療方法ならびに治療剤を提供すること。

【解決手段】

FLT3 mRNAの膜近傍領域、キナーゼ領域またはATP結合領域を標的とするRNA干渉剤をFLT3 mRNAに作用させることにより、FLT3がダウンレギュレーションされ、FLT3 mRNA高発現白血病細胞および／またはFLT3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を優先的に抑制し、アポトーシスを誘発させる方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 5 0 2 5 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 2 0 1 9 2 4 5]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 4 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号

氏 名

タカラバイオ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.